

Produksi Xilanase Termofilik Dari Isolat Bakteri Sumber Air Panas Makula' Menggunakan Media Limbah Tongkol Jagung

Lupita Denta Putri*, Hasnah Natsir, Seniwati Dali

^{a)} Program Studi Kimia Fakultas MIPA Universitas Hasanuddin, Makassar 90245

^{b)} Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Hasanuddin, Jl. Perintis Kemerdekaan Km 10 Tamalanrea,
Makassar, Indonesia 90245.

*E-mail : Lupitadenta27@gmail.com

Abstrak

Xilanase merupakan enzim ekstraseluler yang memiliki prospek sebagai enzim penghidrolisis hemiselulosa (xilan). Dalam penelitian ini, dilakukan isolasi bakteri dari sumber air panas Makula', Tana Toraja serta menentukan kondisi optimum dalam memproduksi enzim xilanase. Adapun tahapan yang dilakukan yaitu peremajaan bakteri, pembuatan medium inokulum dan medium produksi, pengukuran OD (*Optical Density*), pengukuran kadar protein dan pengujian aktivitas xilanase. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa waktu produksi untuk *B. stearothermophilus* SL3A adalah pada jam ke-48 dengan nilai aktivitas 0,1237 mU/mL dan *B. stearothermophilus* SL3S pada jam ke-60 dengan nilai aktivitas 0,1593 mU/mL. *B. stearothermophilus* SL3A memiliki kadar protein 9,59 mg/mL dan untuk *B. stearothermophilus* SL3S memiliki kadar protein 10,07 mg/mL. Karakteristik xilanase dari bakteri *B. stearothermophilus* SL3A dan *B. stearothermophilus* SL3S bekerja optimum pada pH 7 suhu 45 °C. Ekstrak kasar enzim xilanase hasil isolasi dapat menghidrolisis substrat xilan dari tongkol jagung. Penambahan logam CaCl₂, MgCl₂, NiCl₂ dapat meningkatkan aktivitas enzim xilanase dan CoCl₂ menurunkan aktivitas enzim sehingga bersifat inhibitor.

Kata kunci: *Bacillus stearothermophilus*, Xilan, Xilanase

Abstract

Xylanases is an extracellular enzyme that has prospects as enzymes that hydrolyze hemicellulose (xylan). In this study, carried out isolated of bacteria from the hot springs Makula', Tana Toraja and determine the optimum conditions in producing the xylanase enzyme. The steps being taken are the rejuvenation of bacteria, the manufacture medium inoculum and the production medium, the measurement OD (*Optical Density*) measurements of protein and testing activities xylanase. The results obtained showed that the production time for *B. stearothermophilus* SL3A is in the 48 hours with a value of 0.1237 activity mU/mL and *B. stearothermophilus* SL3S at the 60 hours with a value of 0.1593 activity mU/mL. *B. stearothermophilus* SL3A have a protein content of 9.828 mg/mL and for *B. stearothermophilus* SL3S have a protein content of 10.07 mg/mL. Characteristics bacterial xylanase from *B. stearothermophilus* SL3A and *B. stearothermophilus* SL3S work optimally at pH 7 a temperature of 45 °C. Crude extract of the isolated xylanase enzyme can hydrolyze substrate is xylan corn cobs. The addition of metal CaCl₂, MgCl₂, CaCl₂ can increase the activities of the enzyme xylanase and CoCl₂ decreases the activities of enzymes that are inhibitors.

Keywords : *Bacillus stearothermophilus*, Xylan, Xylanases

PENDAHULUAN

Perkembangan teknologi di berbagai bidang sangat memudahkan untuk melakukan berbagai hal dan memberikan banyak keuntungan. Salah satu teknologi di dalam bidang sains adalah bioteknologi yang mempelajari pemanfaatan makhluk hidup (bakteri, fungi dan virus), maupun produk dari makhluk hidup (enzim dan alkohol) dalam proses produksi untuk menghasilkan barang dan jasa. Bioteknologi di era modern banyak menghasilkan produk dalam skala industri (Amien, 2012). Enzim memegang peran an penting dalam industri antara lain α -amilase, protease, dan xilanase.

Xilanase merupakan salah satu enzim yang diperlukan oleh industri yaitu industri kertas sebagai pemutih kertas dan biokonversi lignoselulosa untuk bahan bakar. Xilanase merupakan enzim golongan hidrolase yang mempunyai kemampuan menghidrolisis xilan (hemiselulosa) menjadi xilo-oligosakarida dan xilosa. Penggunaan xilanase pada proses pra-pemutihan *pulp* dapat menurunkan jumlah senyawa klorin yang digunakan (Susilowati dkk., 2012). Xilanase dapat dihasilkan oleh mikroba melalui proses fermentasi, yang biasanya dihasilkan oleh bakteri atau khamir (Richana dkk., 2008).

Salah satu bakteri penghasil xilanase adalah bakteri termofilik. Bakteri termofilik adalah bakteri yang dapat tumbuh pada suhu tinggi antara 45-55 °C (Patong, 2013). Bakteri termofilik berasal dari sumber air panas dan kawah gunung berapi (daerah geotermal) berpotensi untuk menghasilkan enzim termostabil, karena kemampuan enzim bekerja pada suhu tinggi yang dipengaruhi oleh kondisi lingkungan tempat tumbuh bakteri tersebut (Susilowati dkk., 2012).

Indonesia khususnya Sulawesi Selatan memiliki sumber air panas yang menjadi media bagi pertumbuhan mikroorganisme termofilik. Sumber air panas Makula', kabupaten Tana Toraja salah satu sumber geotermal yang merupakan lokasi

pengambilan sampel bakteri termofilik penghasil enzim xilanase. Beberapa penelitian telah berhasil mengisolasi dan mengkarakterisasi bakteri termofilik penghasil enzim xilanase, diantaranya isolat bakteri M-13.2A asal air laut Manado memiliki aktivitas optimum pada pH 8 dan suhu 70 °C (Fawzya dkk., 2013) dan isolat bakteri IIA-3 yang diisolasi dari sumber air panas Sonai, Sulawesi Tenggara berpotensi xilanolitik pada suhu 50 °C dan pH 9 (Susilowati dkk., 2012).

Produksi enzim xilanase oleh mikroorganisme memerlukan substrat sebagai penginduksi yaitu xilan. Penggunaan xilan murni pada skala industri terlalu mahal, maka limbah pertanian yang memiliki komponen utama lignoselulosa diharapkan dapat digunakan sebagai sumber karbon (Trismilah dan Waltam, 2009). Salah satu sasaran dalam pengembangan bioteknologi adalah merintis pemanfaatan mikroorganisme dalam biokonversi limbah. Dengan menggunakan jasa mikroorganisme, pemanfaatan limbah berlignoselulosa dapat menghasilkan enzim ekstraseluler yang mampu mendegradasi bahan berlignoselulosa menjadi fraksi penyusunnya (Richana, 2002).

Menurut Fachry (2013), limbah lignoselulosa adalah limbah pertanian yang mengandung hemiselulosa, selulosa dan lignin. Salah satu limbah pertanian yang mengandung lignoselulosa dan ketersediaannya berlimpah di alam adalah tongkol jagung. Mengingat produksi jagung di Indonesia merupakan produksi dengan skala besar maka akan dengan mudah mendapatkan limbah tongkol jagung terutama di daerah pedesaan (Richana dkk., 2007).

Hasil penelitian Setyawati (2006), menunjukkan limbah pertanian seperti tongkol jagung memiliki kandungan hemiselulosa sebesar 40 % yang merupakan substrat xilanase yang digunakan sebagai sumber karbon.

Tongkol jagung merupakan bahan berlignoselulosa yang mengandung xilan tertinggi sebesar 12,4 % dibanding limbah pertanian lain (Richana, 2004 dalam Salupi, 2011). Dengan demikian dalam penelitian ini dilakukan isolasi mikroba termofilik sumber air panas Makula', Tana Toraja untuk memproduksi enzim xilanase dengan menggunakan limbah tongkol jagung sebagai substratnya.

Bahan dan Metode

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tongkol jagung, xilan murni, sampel air dan sedimen dari sumber air panas Makula', Tana Toraja, pepton, yeast ekstrak, NaCl, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4 , NaOH, bakto agar, , alkohol 70%, spiritus, aluminium foil, pereaksi DNS, buffer sitrat dan buffer fosfat dan kertas pH universal.

Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah cawan petri, jarum ose, erlenmeyer, ayakan 100 mesh, neraca analitik, oven, *magnetic stirrer*, *autoclave*, inkubator, *shaker waterbath*, *hotplate*, spektrometer UV-Vis, dan alat-alat gelas lain yang umum digunakan di laboratorium.

Metode

1. Pengambilan Sampel

Sampel air di sumber air panas Makula', Tana Toraja diambil sebanyak 100 mL dan sampel sedimen diambil sebanyak 4 g. Sebelum sampel air dan sedimen diambil terlebih dahulu dilakukan pengukuran parameter fisika dan kimia di lokasi. Parameter yang diukur adalah suhu dan pH sampel. Sampel kemudian dimasukkan ke dalam botol steril berwarna cokelat lalu dimasukkan ke dalam *cool box* yang diberi es dan dibawa ke laboratorium untuk dianalisis lebih lanjut.

2. Isolasi dan Pemurnian Bakteri Penghasil Xilanase

Sampel air dan sedimen masing-masing dimasukkan dalam medium pengayaan (yeast ekstrak 0,5%, NaCl 1%, pepton 1%)

dengan perbandingan 1 : 2 lalu kocok selama 24 jam dengan menggunakan shaker. Setelah itu sebar diatas permukaan media padat sebanyak 200 μL dan diratakan dengan menggunakan batang pengaduk berbentuk L, lalu diinkubasi pada suhu 40 °C selama beberapa hari. Isolat yang tumbuh dengan baik dimurnikan dengan menggores kuadran beberapa kali lalu diinkubasi kembali pada suhu 40 °C. Setelah isolat murni diperoleh, gores kuadran pada media padat seleksi bakteri penghasil xilanase (media substrat) dan diinkubasi selama 2 hari pada suhu 40 °C. Pada media padat selektif diketahui bahwa isolat berpotensi sebagai penghasil xilanase dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni. Selanjutnya bakteri hasil seleksi ditumbuhkan dalam media padat yang mengandung tongkol jagung sebagai substrat.

3. Karakterisasi Morfologi Bakteri Penghasil Xilanase

Isolat bakteri penghasil xilanase yang telah dimurnikan pada media substrat tongkol jagung, dikarakterisasi morfologinya dengan melakukan beberapa pengamatan pada morfologi isolat. Pengamatan yang dilakukan meliputi pengamatan secara mikroskopis, makroskopis, dan uji biokimia sederhana.

4. Penentuan Waktu Optimum Produksi Xilanase

Isolat terpilih kemudian diinokulasikan pada medium inokulum yang mengandung tongkol jagung lalu diinkubasi pada suhu 40 °C, pH 7, dan kecepatan *shaker waterbath* 150 rpm selama 24 jam. Sebanyak 10 % diinokulasikan ke dalam medium produksi, lalu diinkubasi pada *shaker waterbath* pada suhu 40 °C, pH 7, dan kecepatan 150 rpm selama 5 hari. Setiap 12 jam sampling dilakukan untuk pengukuran pertumbuhan mikroba yang dikenal dengan pengukuran OD (*Optical Density*) pada panjang gelombang 600 nm, pengukuran aktivitas enzim xilanase serta analisis proteinnya (Nakamura dkk., 1993).

5. Pengujian Aktivitas Xilanase

Aktivitas enzim xilanase diukur dengan mendeteksi gula pereduksi yang terbentuk menggunakan reagen DNS. Aktivitas enzim diukur dengan mencampur 1 mL enzim, 1 mL substrat xilan 1 %, larutan buffer fosfat pH 7,0 (dibuat duplo) kemudian diinkubasi pada suhu 40 °C selama 60 menit. Inkubasi dihentikan dengan penambahan 3 mL pereaksi DNS, selanjutnya dipanaskan dalam air mendidih selama 30 menit. Absorbansi diukur pada panjang gelombang maksimum dan digunakan standar xilosa sebagai pembanding (Nakamura dkk., 1993 dan Susilowati dkk., 2012). Aktivitas enzim xilanase dapat dihitung dengan rumus:

$$\frac{\text{Kadar Xilosa } (\mu\text{g}/\text{mL})}{\text{Berat Molekul Xilosa}(\text{gr}/\text{mol}) \times \text{Waktu Inkubasi}(\text{menit})}$$

Satu unit aktivitas xilanase (U/mL) didefinisikan sebagai jumlah enzim yang melepaskan μmol xilosa per menit.

6. Pengukuran Kadar Protein Metode Lowry

Komposisi reagen Lowry B adalah Na_2CO_3 2 % dalam NaOH 0,1 N; CuSO_4 1 %; Natrium-kalium-tartrat (100 :1:1) dengan reagen Lowry A adalah larutan asam phosphotungstic-phospho-molybdic (Foolin) : Akuades (1:1). Kadar protein diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum dengan menggunakan BSA (Bovine Serum Albumin) sebagai standar (Lowry dkk., 1951).

Enzim xilanase sebanyak 1 mL, larutan standar sebanyak 1 mL, akuades sebanyak 1 mL masing-masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan larutan Lowry B sebanyak 2,5 mL, dihomogenkan lalu didiamkan selama 10 menit. Selanjutnya ditambahkan Lowry A sebanyak 0,25 mL dan diinkubasi kembali pada 25 °C selama 30 menit dengan sesekali dikocok, kemudian absorbansi diukur pada panjang gelombang maksimum BSA yang telah ditentukan dengan spektrometer *UV-Vis*.

7. Karakterisasi Enzim Xilanase (Susilowati dkk., 2012 dan Natsir dkk., 2010)

a. Penentuan Suhu Optimum

Suhu enzim yang digunakan adalah 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, dan 55 °C. Sebanyak 1 mL enzim, 1 mL substrat xilan 1% dan buffer fosfat hingga pH 7,0 (dibuat duplo) dicampur dan diinkubasi selama 60 menit pada kisaran suhu 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, dan 55 °C. Inkubasi dihentikan dengan penambahan pereaksi DNS sebanyak 3 mL, selanjutnya dipanaskan dalam air mendidih selama 30 menit. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 450 nm dan digunakan standar xilosa sebagai pembanding. Diperoleh aktivitas xilanase optimum pada suhu tertentu.

b. Penentuan pH Optimum Enzim

Larutan buffer ditambahkan sebagai penyangga pH. Digunakan larutan buffer sitrat untuk kisaran pH 5 dan pH 6 lalu buffer fosfat untuk pH 7 dan pH 8. Sebanyak 1 mL enzim, 1 mL substrat xilan 1% divariasikan pada pH 5;6;7;8 (dibuat duplo) dicampur dan diinkubasi selama 60 menit pada suhu optimum yang telah didapatkan. Inkubasi dihentikan dengan penambahan pereaksi DNS sebanyak 3 mL, selanjutnya dipanaskan dalam air mendidih selama 30 menit. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 450 nm dan digunakan standar xilosa sebagai pembanding. Diperoleh aktivitas xilanase optimum pada pH tertentu.

c. Penentuan Konsentrasi Optimum Substrat

Variasi substrat yang digunakan adalah konsentrasi 0,5%; 0,75%; 1%; 1,25% dan 1,5%. Sebanyak 1 mL enzim, 1 mL substrat xilan dengan konsentrasi 0,5%; 0,75%; 1%; 1,25%; 1,5% dan buffer hingga pH optimum yang telah didapatkan (dibuat duplo) dicampur dan diinkubasi selama 60 menit pada kisaran suhu optimum yang telah didapatkan. Inkubasi dihentikan dengan penambahan pereaksi DNS sebanyak 3 mL, selanjutnya

dipanaskan dalam air mendidih selama 30 menit. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 450 nm dan digunakan standar xilosa sebagai pembanding. Diperoleh aktivitas xilanase optimum pada suhu tertentu.

d. Pengaruh Ion Logam terhadap Aktivitas Enzim

Pengaruh ion logam terhadap aktivitas enzim diuji untuk mengetahui jenis logam apa yang berperan sebagai aktivator atau inhibitor, logam yang digunakan adalah Mg^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , dan Ni^{2+} . Campuran 1 mL enzim, 1 mL substrat konsentrasi optimum, dan buffer hingga pH optimum ditambahkan 1 mL larutan $MgCl_2$; $CaCl_2$; $CoCl_2$; dan $NiCl_2$. Dengan konsentrasi 1 mM dan 5 mM. Diinkubasi selama 60 menit pada kisaran suhu optimum yang telah didapatkan. Inkubasi dihentikan dengan penambahan pereaksi DNS sebanyak 3 mL, selanjutnya dipanaskan dalam air mendidih selama 30 menit. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 450 nm dan digunakan standar xilosa sebagai pembanding. Diperoleh aktivitas xilanase optimum pada suhu tertentu.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Bakteri Termofil Penghasil Enzim Xilanase dari Sumber Air Panas Makula'

Sampel dari masing-masing isolat yang tumbuh dengan baik, dimurnikan dengan menggores kuadran beberapa kali pada media suplemen yang diinkubasi pada berbagai suhu yaitu 40 °C; 45 °C; dan 50 °C dengan pH 7. Hasil pemurnian bakteri pada media suplemen memiliki tingkat pertumbuhan yang berbeda seperti terlihat pada Tabel 1.

Hal ini disebabkan karena beberapa isolat bakteri mampu beradaptasi dan cocok dengan lingkungan tempat tumbuhnya dan beberapa isolat yang lainnya kurang beradaptasi dengan lingkungannya. Setelah isolat murni diperoleh, dilakukan gores kuadran pada media padat seleksi bakteri penghasil xilanase (media substrat) yang mengandung xilan murni 0,5 % dan

diinkubasi selama 48 jam pada suhu 40 °C. Penambahan xilan bertujuan untuk menyeleksi bakteri yang dapat menghasilkan xilanase untuk menghidrolisis xilan (Thoyib dkk., 2007). Pada media padat selektif diketahui bahwa isolat berpotensi sebagai penghasil xilanase dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni seperti terlihat pada Gambar 1.

Tabel 1. Data Pertumbuhan Bakteri yang Diisolasi dari Sumber Air Panas Makula'

Suhu	Isolat	Hasil Goresan			
		Media Suplemen		Media Substrat Xilan Murni	
		Hari 1	Hari 2	Hari 1	Hari 2
40 °C	SL1A	++++	++++	++++	++++
	SL1S	++++	++++	++++	++++
	SL2A	++	++	++	++
	SL3A	+++++	+++++	+++++	+++++
	SL3S	+++++	+++++	+++++	+++++
45 °C	SL1A	++	++	+	+
	SL1S	++	++	+	+
	SL2A	+	+	-	-
	SL3A	+++	+++	+++	+++
	SL3S	+++	+++	+++	+++
50 °C	SL1A	+	+	-	-
	SL1S	+	+	-	-
	SL2A	+	+	-	-
	SL3A	++	+	+	+
	SL3S	++	+	+	+

Keterangan :

-:tidak ada koloni

+:sedikit koloni

++:kurang banyak koloni

+++cukup banyak koloni

++++:banyak koloni

+++++:sangat banyak koloni

Sampel Lokasi 1 Air (SL1A)

Sampel Lokasi 1 Sedimen (SL1S)

Sampel Lokasi 2 Air (SL2A)

Sampel Lokasi 3 Air (SL3A)

Sampel Lokasi 3 Sedimen (SL3S)



Gambar 1. Isolat Bakteri Penghasil Xilanase dengan Substrat Xilan Murni

Bakteri SL1A, SL1S, SL3A dan SL3S paling banyak tumbuh pada media substrat xilan murni dengan suhu inkubasi 40 °C sehingga isolat tersebut sebagai isolat pilihan yang akan diteliti lebih lanjut. Isolat terpilih ini dimurnikan kembali ke dalam media padat yang mengandung xilan dari tongkol jagung sebagai substratnya (Gambar 3). Bakteri xilanolitik

merupakan bakteri yang mampu memanfaatkan xilan sebagai sumber karbon yang menghasilkan energi dan umumnya menghasilkan xilanase ekstraseluler.

Tabel 2. Pertumbuhan Bakteri pada Media Substrat Xilan Murni dan Xilan dari Tongkol Jagung

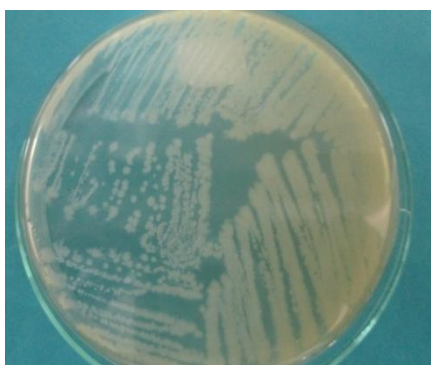
Suhu	Isolat	Hasil Goresan			
		Media Substrat Xilan Murni		Media Substrat Xilan Tongkol Jagung	
		Hari 1	Hari 2	Hari 1	Hari 2
40 °C	SL1A	+++	+++	+++	++++
	SL1S	+++	+++	+++	++++
	SL3A	++++	++++	++++	+++++
	SL3S	++++	++++	++++	+++++

Keterangan :

+++ :cukup banyak koloni

++++ :banyak koloni

+++++ :sangat banyak koloni



Gambar 2. Isolat Bakteri pada Media Mengandung Tongkol Jagung dan Diinkubasi pada Suhu 40 °C dengan Waktu 48 jam

Identifikasi Bakteri

Isolat bakteri yang telah dimurnikan pada media substrat yang mengandung tongkol jagung selanjutnya diidentifikasi berdasarkan pengamatan secara makroskopis, mikroskopis, dan uji biokimia sederhana. Pengamatan makroskopis isolat memiliki sel berbentuk basil, berantai atau terpisah, ada yang tebal dan tipis. Secara mikroskopis menunjukkan isolat SL1A, SL1S, SL3A dan SL3S termasuk bakteri aerob dan termasuk gram positif karena setelah diberi larutan lugol berwarna biru keunguan. Uji biokimia sederhana terdiri dari uji TSIA (*Triple Sugar Iron*), uji SIM (*Sulfide Indole Motility*), uji MR-VP (*Methyl Red-Voges Proskauer*), uji Sitrat, uji Urea dan uji Karbohidrat yang meliputi

uji Glukosa, uji Laktosa, uji Sukrosa, dan uji Manitol. Hasil uji biokimia terhadap isolat bakteri SL1A, SL1S, SL3A dan SL3S dapat dilihat Tabel 3.

Medium TSIA mengandung 3 macam gula yaitu glukosa, laktosa, dan sukrosa, terdapat juga indikator fenol merah dan FeSO_4 untuk memperlihatkan pembentukan H_2S yang ditunjukkan dengan adanya endapan hitam. Hasil uji pada medium TSIA menunjukkan bahwa bakteri SL1A, SL1S, SL3A, dan SL3S mampu memfermentasikan glukosa. Menurut Lay (1994), bila mikroorganisme hanya dapat memfermentasikan glukosa, maka bagian dasar (*butt*) media akan berwarna kuning (bersifat asam) dan bagian lereng (*slant*) media akan berwarna merah (bersifat basa). Bila mikroorganisme dapat memfermentasikan laktosa atau sukrosa atau keduanya, maka bagian lereng dan dasar media akan berwarna kuning (bersifat asam) serta bagian dasar media kadang terpecah akibat pembentukan gas seperti H_2O dan CO_2 . Dari pengamatan menunjukkan bakteri tidak menghasilkan gas H_2S yang merupakan hasil metabolisme bakteri anaerob.

Medium SIM digunakan untuk mengetahui ada atau tidak pergerakan bakteri. Adanya pemisahan pada agar yang ditandai dengan warna hitam menunjukkan bahwa terdapat pergerakan bakteri dan dapat disimpulkan bahwa bakteri berimigrasi dari garis inokulasi ke bentuk kekeruhan padat medium (Djide dan Sartini, 2006). Hasil uji dengan medium SIM memperlihatkan hasil negatif untuk uji indol, motil, dan H_2S .

Uji MR menunjukkan hasil yang positif bahwa terjadi fermentasi asam campuran pada media tetapi bakteri ini tidak mampu menggunakan fermentasi butanadiol melalui uji VP yang ditandai dengan tidak berubahnya warna kaldu karbohidrat menjadi merah. Menurut Djide dan Sartini (2006), uji MRVP digunakan untuk menentukan adanya fermentasi asam campuran. Bakteri dapat

memfermentasikan glukosa dan menghasilkan berbagai produk yang bersifat asam sehingga akan menurunkan pH media pertumbuhannya lebih rendah. Uji ini juga dilakukan untuk menghasilkan asam melalui proses hidrolisis yang menghasilkan asam organik sederhana.

Tabel 3. Hasil Uji Biokimia Isolat Bakteri

Pengujian	Hasil Uji			
	SL1A	SL1S	SL3A	SL3S
TSIA	Slant	Alkali	Alkali	Alkali
	Butt	Acid	Acid	Acid
	H ₂ S	-	-	-
	Gas	-	-	-
SIM	Indol	-	-	-
	Mot	-	-	-
	H ₂ S	-	-	-
MRVP	MR	+	+	+
	VP	-	-	-
Uji Sitrat	-	-	-	-
Uji Urea	-	-	-	-
Uji Karbohidrat	Glukosa	+	+	+
	Laktosa	-	-	-
	Sukrosa	-	-	-
	Maltosa	-	-	-

Keterangan :

Alkali : bersifat basa (berwarna merah)

Acid : bersifat asam (berwarna kuning)

+: menunjukkan hasil positif

- : menunjukkan hasil negatif

Uji sitrat dan urea menunjukkan hasil yang negatif, isolat bakteri tidak menggunakan sitrat sebagai sumber karbon ditandai dengan tidak adanya perubahan warna menjadi biru. Isolat bakteri juga tidak menghasilkan urea yang ditandai dengan tidak terbentuknya amoniak yang menghasilkan warna merah muda pada media.

Salah satu ciri dalam mengidentifikasi mikroorganisme adalah memiliki kemampuan memfermentasikan berbagai karbohidrat dan produk fermentasi yang dihasilkan. Sifat mikroba, media biakan yang digunakan, serta faktor lingkungan antara lain pH dan suhu menentukan hasil akhir dari fermentasi karbohidrat. Glukosa merupakan senyawa yang paling sering digunakan oleh mikroorganisme dalam proses fermentasi, selain itu adapula media sukrosa dan laktosa (Djide dan Sartini, 2006). Uji karbohidrat menunjukkan bahwa keempat bakteri tersebut hanya mampu memfermentasi glukosa sedangkan laktosa, sukrosa, dan maltosa menunjukkan hasil yang negatif.

Menurut *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* menyatakan bahwa berdasarkan hasil identifikasi dan uji biokimia terhadap bakteri isolat SL1A, SL1S, SL3A, dan SL3S digolongkan dalam kelompok bakteri *Bacillus stearothermophilus*. Dari keempat isolat ini isolat SL3A dan SL3S merupakan isolat pilihan dan diuji lebih lanjut karena memiliki pertumbuhan yang baik.

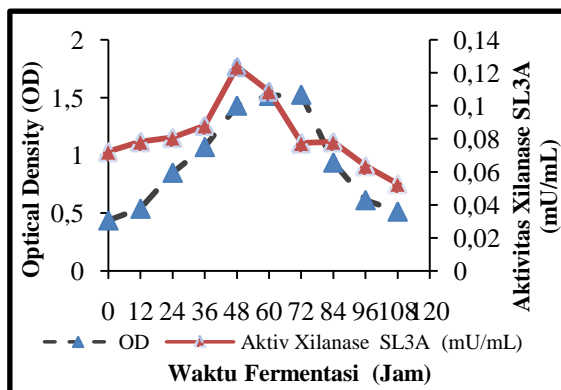
Menurut penelitian yang telah dilakukan Richana (2008), isolat yang mampu tumbuh dengan baik memberikan indikasi bahwa bakteri tersebut mampu memanfaatkan satu-satunya sumber karbon dalam media pertumbuhan, yaitu xilan. Dengan demikian produksi enzim akan lebih baik jika menggunakan isolat-isolat yang mampu tumbuh dengan baik pada substrat yang diinduksi dengan xilan. Pengujian isolasi bakteri yang dilakukan Richana (2008) menghasilkan 25 koloni yang mampu tumbuh pada media xilan dan dapat menghasilkan zona bening, dengan diameter lebih dari 3 mm. Isolasi bakteri yang dilakukan berasal dari tanah tempat pembuangan limbah tapioka dengan pH asam dan tanah berkapur dengan pH lebih dari 7. Hasil pengukuran aktivitas xilanase pada beberapa isolat uji menunjukkan aktivitas tertinggi dicapai oleh isolat RXA-III5 sebesar 11,182 U/mL.

Penentuan Waktu Optimum Produksi Enzim Xilanase

Data pertumbuhan bakteri menunjukkan bahwa bakteri SL3A (Gambar 3) dan SL3S (Gambar 4) mengalami fase adaptasi, pada jam ke-0 hingga jam ke-12. Bakteri mulai menyesuaikan diri dengan lingkungannya yang baru sehingga sel belum membelah. Selama kondisi awal, sel menyerap nutrisi dan meningkatkan ukuran sel. Walaupun populasi tidak berubah karena hanya terjadi perubahan ukuran sel, massa sel, dan kerapatan optis mulai meningkat (Sopandi dan Wardah, 2013).

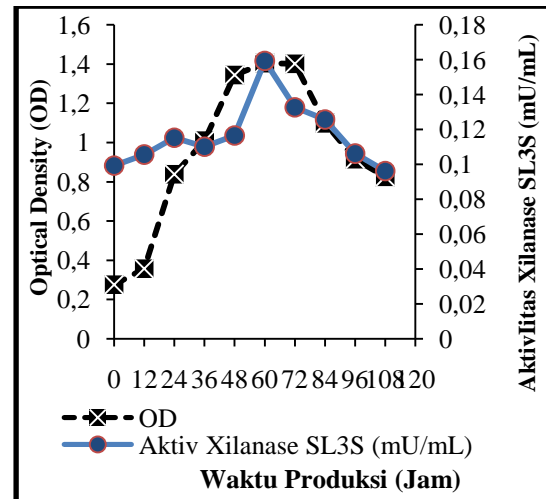
Data waktu fermentasi isolat SL3A (Gambar 3) dan SL3S (Gambar 4) pada

jam ke-12 sampai jam ke-48 menunjukkan fase eksponensial dimana pada fase ini sel bakteri sangat aktif membelah. Hal ini menunjukkan bahwa semua sel berkembang biak karena kebutuhan nutrisinya tercukupi dan metabolisme sel berlangsung cepat (Sopandi dan Wardah, 2013). Pertumbuhan bakteri SL3A (Gambar 3) dan SL3S (Gambar 4) mulai melambat ketika memasuki fase stasioner pada jam ke-48 hingga jam ke-72. Hal ini disebabkan nutrisi dan substrat di dalam media mulai berkurang, sebagian sel dari populasi mati dan sebagian masih melakukan pembelahan sel sehingga stabilitas kehidupan dipertahankan. Fase kematian terjadi pada bakteri SL3A dan SL3S jam ke-84, hal ini terjadi karena jumlah substrat dan nutrisi hampir habis sehingga sel semakin lama sudah tidak dapat tumbuh lagi.



Gambar 3. Kurva Pertumbuhan dan Aktivitas Xilanase dari Bakteri *B. stearothermophilus* SL3A selama waktu Produksi pada kondisi suhu 40 °C, [xilan tongkol jagung] 0,5 % dan kecepatan 150 rpm

Pengujian aktivitas ekstrak kasar xilanase dilakukan dengan menggunakan xilan 1 % sebagai substrat, buffer fosfat pH 7, dan suhu inkubasi 40 °C selama 1 jam. Hasil penelitian menunjukkan bahwa waktu produksi optimum xilanase dari isolat *B. stearothermophilus* SL3A (Gambar 3) dan SL3S (Gambar 4) memiliki perbedaan. Waktu produksi optimum xilanase untuk isolat *B. stearothermophilus* SL3A (Gambar 3) adalah pada jam ke-48 dengan aktivitas enzim sebesar 0,1237 mU/mL.



Gambar 4. Kurva Pertumbuhan dan Aktivitas Xilanase dari Bakteri *B. stearothermophilus* SL3S selama waktu Produksi pada kondisi suhu 40 °C, [xilan tongkol jagung] 0,5 % dan kecepatan 150 rpm

Hal ini menggambarkan banyaknya xilan yang dapat dihidrolisis oleh enzim xilanase menjadi xilosa. Aktivitas enzim mengalami penurunan pada jam ke-60. Sedangkan waktu produksi optimum xilanase untuk isolat *B. stearothermophilus* SL3S (Gambar 4) adalah pada jam ke-60 dengan aktivitas enzim sebesar 0,1593 mU/mL, dan pada jam ke-72 aktivitas enzim mulai menurun, karena berkurangnya kemampuan bakteri untuk menghasilkan enzim xilanase dalam menghidrolisis xilan. Kondisi pada kerapatan sel dan ketersediaan nutrisi didalam medium semakin berkurang menjadi penyebab berkurangnya kemampuan bakteri. Hasil penelitian yang dilakukan oleh Septiningrum dan Apriana (2011) memproduksi enzim xilanase dari tongkol jagung menggunakan *B. circulans*, menunjukkan aktivitas xilanase mulai terbentuk pada hari ke-2 dengan aktivitas 1,544 U/mL kemudian meningkat tajam sampai hari ke-4, lalu aktivitasnya menurun hingga hari ke-7 dengan aktivitas 5,102 U/mL. Aktivitas xilanase tertinggi diperoleh pada hari ke-4 dengan aktivitas sebesar 11,006 U/mL.

Pengukuran Kadar Protein

Hasil pengukuran kadar protein dengan menggunakan metode Lowry menghasilkan data sebagaimana terlihat pada Tabel 4. Hasil pengukuran menunjukkan kadar protein tertinggi untuk SL3A diperoleh pada jam ke-48 sebesar 9,59 mg/mL. Untuk SL3S memiliki kadar protein tertinggi pada jam ke-60 sebesar 10,07 mg/mL.

Tabel 4. Data Pengukuran Kadar Protein *B. stearotheophilus* SL3A dan SL3S

Waktu Fermentasi	Kadar Protein Isolat SL3A (mg/mL)	Kadar Protein Isolat SL3S (mg/mL)
0	6,305	6,52
12	6,545	7,895
24	7,155	5,935
36	5,775	8,77
48	9,59	8,08
60	6,785	10,07
72	6,385	7,895
84	9,485	5,725
96	7,048	5,855
108	7,235	6,705

Menurut penelitian yang telah dilakukan oleh Budiman dan Setyawan (2013), protein terlarut yang terukur tidak mutlak mencerminkan bahwa yang terukur semuanya enzim yang disintesis oleh mikroorganisme, karena di dalam media juga mengandung protein terlarut berupa sisa media (yeast ekstrak) atau hasil metabolisme protein mikroorganisme yang disekresikan.

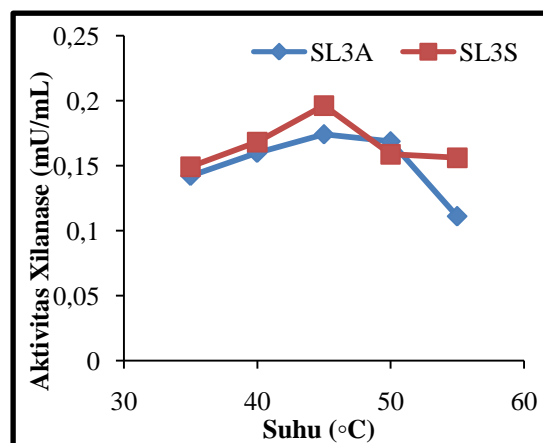
Karakterisasi Enzim Xilanase

Karakterisasi enzim xilanase dilakukan dengan menguji aktivitas enzim xilanase ekstrak kasar terhadap pengaruh suhu, pH, substrat dan pengaruh ion logam. Karakterisasi dilakukan untuk mengetahui kondisi optimum proses fermentasi enzim xilanase ekstrak kasar. Enzim yang dikarakterisasi adalah enzim xilanase SL3A dan SL3S yang memiliki aktivitas tertinggi yaitu pada waktu produksi optimum jam ke-48 dan jam ke-60.

Penentuan Suhu Optimum

Penentuan suhu optimum bakteri SL3A dan SL3S dalam menghasilkan enzim xilanase dilakukan proses inkubasi enzim dengan buffer fosfat pH 7 dan xilan 1 %. Suhu divariasikan mulai 35 °C hingga 55 °C. Hasil yang diperoleh dapat dilihat

pada Gambar 5. Aktivitas xilanase meningkat seiring dengan peningkatan suhu inkubasi, namun setelah mencapai suhu maksimum aktivitasnya menurun. Suhu optimum xilanase dari isolat SL3A dan SL3S (Gambar 5) yaitu 45 °C dengan nilai aktivitas enzim xilanase masing-masing sebesar 0,1742 mU/mL dan 0,1962 mU/mL. Aktivitas xilanase menurun setelah suhu 50 °C. Hal ini disebabkan karena pada suhu rendah reaksi kimia berlangsung lambat, sedangkan pada suhu yang lebih tinggi reaksi berlangsung lebih cepat akan tetapi kenaikan suhu dapat menyebabkan terjadinya proses denaturasi serta mengurangi kecepatan reaksi. Suhu optimum yaitu suhu yang menyebabkan terjadinya reaksi kimia dengan kecepatan paling besar.



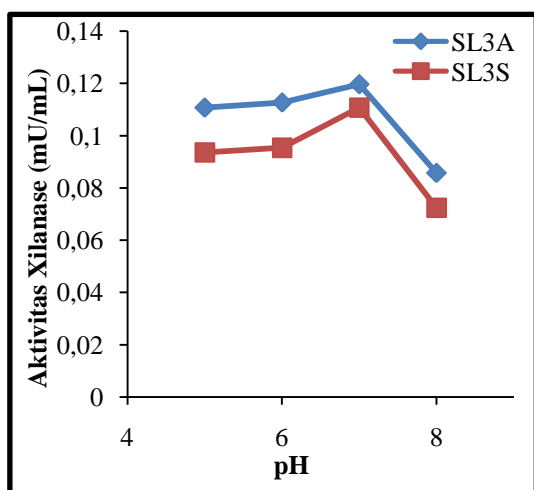
Gambar 5. Pengaruh Suhu Terhadap Aktivitas Xilanase dari isolat SL3A dan isolat SL3S, pada kondisi pH 7 dan [Xilan] 1 %

Penelitian yang telah dilakukan oleh Susilowati dkk. (2012), tentang enzim xilanase yang diisolasi dari sumber air panas Sonai, Sulawesi Tenggara memiliki aktivitas tertinggi pada pH 9 dan suhu 50 °C dengan menggunakan sekam padi sebagai substrat. Richana dkk. (2008) juga berhasil mengisolasi bakteri penghasil xilanase dari tanah limbah tapioka yang memiliki aktivitas tertinggi pada pH 9 dan suhu 50 °C. Richana dan Lestina (2003) telah melakukan penelitian tentang enzim xilanase dari isolat AIII-5

dengan sumber xilan dari kulit kedelai memiliki aktivitas 35 °C dengan pH 9.

Penentuan pH Optimum

Penentuan pH optimum bakteri SL3A dan SL3S dalam menghasilkan enzim xilanase digunakan buffer fosfat-sitrat pada pH 5, 6, 7 dan buffer fosfat untuk pH 8 pada suhu 45 °C yang merupakan suhu optimum yang diperoleh dari hasil karakterisasi pengaruh suhu. Untuk hasil penelitian tersebut dapat dilihat pada Gambar 6. Data hasil pengaruh pH terhadap aktivitas enzim xilanase dari *B. stearrowthermophilus* SL3A dan *B. stearrowthermophilus* SL3S, menunjukkan aktivitas enzim pada mulanya mengalami peningkatan seiring bertambahnya nilai pH yang digunakan sehingga pada saat berada pada buffer fosfat-sitrat pH 7 aktivitas enzim menunjukkan nilai tertinggi.



Gambar 6. Pengaruh pH terhadap Aktivitas Enzim Xilanase dari *B. stearrowthermophilus* SL3A dan SL3S, pada kondisi suhu 45 °C dan [Xilan] 1 %

Aktivitas enzim xilanase (Gambar 6) dari *B. stearrowthermophilus* SL3A yaitu 0,1197 mU/mL dan 0,1108 mU/mL untuk *B. stearrowthermophilus* SL3S. Aktivitas enzim mulai menurun pada buffer fosfat pH 8 dengan nilai masing-masing aktivitas sebesar 0,0858 mU/mL dari *B. stearrowthermophilus* SL3A dan 0,0724 mU/mL untuk *B. stearrowthermophilus* SL3S. Berdasarkan data yang diperoleh ini dapat diketahui bahwa pH optimum enzim xilanase yang diperoleh pada penelitian ini

berada pada buffer fosfat-sitrat pH 7. Hasil penelitian yang dilakukan oleh Habibie dkk. (2014), karakterisasi enzim xilanase kasar dari *B. lichenformis* menunjukkan optimum pada suhu 50 °C dengan pH 7 menggunakan tongkol jagung sebagai substrat pengganti xilan. Palaniswamy dkk. (2012), juga berhasil melakukan penelitian tentang produksi enzim xilanase menggunakan limbah agro-industri sebagai substrat yang memiliki aktivitas optimum pada suhu 50 °C dengan pH 5.

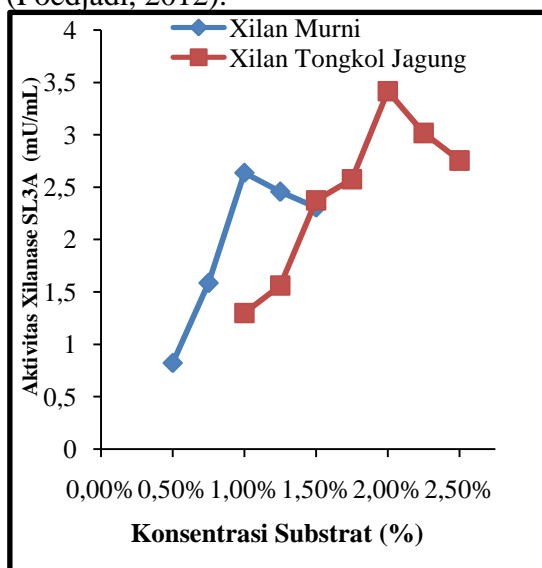
Penentuan Konsentrasi Substrat Optimum

Hasil penggunaan enzim ekstrak kasar xilanase dalam menghidrolisis masing-masing substrat yang digunakan yaitu xilan murni dan xilan tongkol jagung dapat dilihat pada Gambar 7 dan 8.

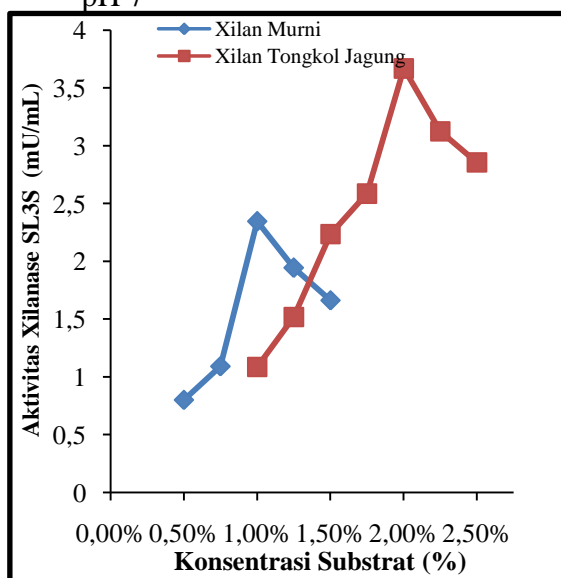
Variasi konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim bertujuan untuk mengetahui kondisi optimum substrat yang dapat bereaksi dengan enzim. Berdasarkan hasil penelitian pada konsentrasi 1 % pengaruh konsentrasi substrat xilan murni terhadap aktivitas enzim xilanase dari *B. stearrowthermophilus* SL3A (Gambar 7) dan *B. stearrowthermophilus* SL3S (Gambar 8) masing-masing sebesar 2,636 mU/mL dan 2,345 mU/mL. Pada konsentrasi substrat xilan 1 % menunjukkan bahwa semua bagian aktif telah jenuh dengan substrat sehingga pada konsentrasi ini merupakan konsentrasi optimum terhadap aktivitas enzim xilanase.

Konsentrasi optimum substrat xilan tongkol jagung 2 % terhadap aktivitas enzim xilanase dari *B. stearrowthermophilus* SL3A (Gambar 7) dan *B. stearrowthermophilus* SL3S (Gambar 8) masing-masing sebesar 3,417 mU/mL dan 3,668 mU/mL. Pada konsentrasi substrat rendah, bagian aktif enzim hanya menampung substrat sedikit dan bila konsentrasi substrat diperbesar, makin banyak substrat yang dapat berhubungan dengan enzim pada bagian aktif. Jadi makin besar konsentrasi substrat maka

makin besar kecepatan reaksi dan pada suatu batas konsentrasi tertentu, semua bagian aktif telah jenuh dengan substrat (Poedjadi, 2012).



Gambar 7. Pengaruh Konsentrasi Substrat Xilan Murni dan Xilan Tongkol Jagung terhadap Aktivitas Enzim Xilanase dari *B. stearrowthermophilus* SL3A, pada kondisi suhu 45 °C dan pH 7



Gambar 8. Pengaruh Konsentrasi Substrat Xilan Murni dan Xilan Tongkol Jagung terhadap Aktivitas Enzim Xilanase dari *B. stearrowthermophilus* SL3S, pada kondisi suhu 45 °C dan pH 7

Pengaruh Penambahan Ion Logam

Pada penelitian ini, untuk mengetahui jenis ion logam yang berperan sebagai enzim xilanase SL3S (Tabel 5) untuk

aktivator atau inhibitor maka ditambahkan berbagai jenis ion logam seperti CaCl_2 ; MgCl_2 ; NiCl_2 ; dan CoCl_2 dalam pengukuran aktivitas enzim. Terdapat dua konsentrasi berbeda yang digunakan untuk tiap jenis ion logam, yaitu 1 mM dan 5 mM. Hasil yang diperoleh dapat dilihat pada Tabel 5 dan 6.

Tabel 5. Pengaruh Konsentrasi Ion Logam Terhadap Aktivitas Enzim Xilanase SL3A pada substrat tongkol jagung 2 %, suhu 45 °C, dan pH 7

Ion Logam	% Aktivitas SL3A	
	5 mM	1 mM
CoCl_2	74,93%	45,10%
CaCl_2	151,70%	105,30%
MgCl_2	115,00%	106,30%
NiCl_2	101,00%	101,50%
Kontrol	100%	

Tabel 6. Pengaruh Konsentrasi Ion Logam Terhadap Aktivitas Enzim Xilanase SL3S pada substrat tongkol jagung 2 %, suhu 45 °C, dan pH 7

Logam	% Aktivitas SL3S	
	5 mM	1 mM
CoCl_2	90%	43%
CaCl_2	145%	76%
MgCl_2	106,60%	95%
NiCl_2	103,10%	98%
Kontrol	100%	

Penambahan ion logam CaCl_2 ; MgCl_2 ; dan NiCl_2 baik pada konsentrasi 1 mM dan 5 mM dapat meningkatkan aktivitas enzim xilanase SL3A (Tabel 5) dan SL3S (Tabel 6). Sebagai aktivator, ion logam meningkatkan aktivitas reaksi enzimatik dengan cara katalisis asam basa, katalisis kovalen, pendekatan reaktan dan induksi dalam enzim atau substrat (Prima, 2012). Pada konsentrasi 1 mM untuk enzim xilanase SL3A (Tabel 10) penambahan ion logam CaCl_2 , MgCl_2 , NiCl_2 aktivitas enzim xilanase masing-masing 105,30 %; 106,30 % dan 101,50 %, sedangkan untuk konsentrasi 5 mM berturut-turut 151,70 %; 115 % dan 101 %. Untuk

konsentrasi 1 mM aktivitas enzim berturut-turut 76 %; 95 %; dan 97,6 %, sedangkan konsentrasi 5 mM penambahan logam CaCl_2 , MgCl_2 , NiCl_2 aktivitas enzim xilanase masing-masing 145 %; 106,60 %; dan 103,10 %. Penambahan ion logam CoCl_2 pada enzim xilanase SL3A (Tabel 5) dan enzim xilanase SL3S (Tabel 6) baik pada konsentrasi 1 mM dan 5 mM menurunkan aktivitas enzim sehingga bersifat inhibitor. Penghambatan aktivitas enzim akibat penambahan ion logam diduga karena ion logam tersebut mempengaruhi sisi aktif enzim xilanase sehingga struktur tiga dimensi enzim tidak sesuai dengan substrat. Hal tersebut menyebabkan substrat tidak dapat berikatan dengan sisi aktif enzim, sehingga reaksi berjalan lambat (Prima, 2012).

Hasil penelitian yang telah dilakukan oleh Richana dkk. (2008) menunjukkan bahwa penambahan ion Fe^{2+} pada enzim xilanase yang diisolasi dari *B. pumilus* RXA-III5 merupakan aktivator tertinggi kemudian diikuti Cu^{2+} dan Co^{2+} , sedangkan penambahan ion Mg^{2+} menurunkan aktivitas enzim. Penelitian yang telah dilakukan oleh Prima (2012), penambahan ion Mg^{2+} dan Zn^{2+} pada enzim xilanase dari *Acinetobacter baumannii* M-13.2A dapat meningkatkan aktivitas xilanase sedangkan penambahan Fe^{3+} dan Ca^{2+} menurunkan aktivitas enzim. Hal ini menunjukkan bahwa setiap enzim memiliki aktivator atau inhibitor pada ion logam yang berbeda.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh, disimpulkan :

1. Isolat bakteri termofilik penghasil enzim xilanase yang diisolasi dari sumber air panas Makula', Tana Toraja adalah *Bacillus stearothermophilus*.
2. Kondisi optimum enzim xilanase menggunakan limbah tongkol jagung untuk isolat SL3A diperoleh pada waktu fermentasi 48 jam dengan aktivitas 0,1237 mU/mL dan untuk isolat SL3S pada jam ke-60 dengan

aktivitas 0,1593 mU/mL.

3. Ekstrak kasar enzim xilanase dapat menghidrolisis xilan dari tongkol jagung pada kondisi optimum pH 7 dan suhu 45 °C, diaktifkan oleh ion Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} dan dihambat oleh ion Co^{2+} .

DAFTAR PUSTAKA

- Budiman, A., dan Setyawan, S., 2013, *Pengaruh Konsentrasi Substrat, Lama Inkubasi dan Ph dalam Proses Isolasi Enzim Xilanase dengan Menggunakan Media Jerami Padi*, Jurusan Teknik Kimia Fakultas Teknik Universitas Diponegoro.
- Cappucino, J.G., 1983, *Microbiology: A Laboratory Manual*, Addison Wesley, Publishing Company.
- Djide, M.N., dan Sartini, 2006, *Mikrobiologi Farmasi Dasar*, Universitas Hasanuddin, Makassar.
- Habibie, F.M., Wardani, A.K., dan Nurcholis, M., 2014, Isolasi dan Identifikasi Molekuler Mikroorganisme Termofilik Penghasil Xilanase dari Lumpur Panas Lapindo, *Jurnal Pangan dan Agroindustri*, 2(4): 231-238.
- Lay, W., 1994, *Analisa Mikroba di Laboratorium*, PT. Raja Grafindo Persada, Jakarta.
- Nakamura, S., Wakabayashi, K., Nakai, R., Aono, R., and Horikoshi, K., 1993, Purification and Some Properties of an Alkaline Xylanase from Alkaliphilic *Bacillus* sp. Strain 41M-1, *Applied and Environmental Microbiology*, 59(7): 2311-2316.
- Natsir, H., Patong, A.R., Suhartono, M.T. and Ahmad A., 2010, Production and Characterization of Chitinase Enzymes from Hot Spring in South Sulawesi, *Bacillus* sp. HSA3-1a, *Indo. Journa. of Chem*, 10(2): 256-260.
- Natsir, H., Patong, A.R., Suhartono, M.T. and Ahmad, A. 2013. Isolation and

- Purification of Thermostable Chitinase *Bacillus licheniformis* Strain HSA3-1a From Sulili Hot Springs in South Sulawesi, Indonesia, *Int. Journal of Pharm. Bio Sciences*, **4**(3): 1252–1259.
- Palaniswamy, M., Arulanandham, T.V., dan Angayarkanni, J., 2012, Production of Xylanase by Litter Degrading Fungal Species Using Agro-Industrial Wastes as Substrates by Solid State Fermentation, *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, **3**(1): 143-149.
- Patong, A.R., 2013, *Analisis Kimia Pangan*, Dua Satu Press, Makassar.
- Poedjadi, A., 2012, *Dasar-dasar Biokimia*, UI-Press, Jakarta.
- Prayitno, D.A., dan Rachmawaty, R., 2011, *Penggunaan Enzim dalam Industri Pangan*, Makalah Teknologi Enzim, Teknik Kimia FT Universitas Diponegoro, Semarang.
- Prima, R.E., 2012, *Produksi dan Karakterisasi Ekstrak Kasar Xilanase dari Acinetobacter baumannii M-13.2A*, Skripsi, diterbitkan, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Departemen Biologi Universitas Indonesia.
- Richana, N., 2002, Produksi dan Prospek Enzim Xilanase dalam Pengembangan Bioindustri di Indonesia, *Buletin AgroBio*, **5**(1): 29- 36.
- Richana, N., dan Lestina, P., 2003, Produksi Xilanase untuk Biokonversi Limbah Biji Kedelai, *Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian*.
- Richana, N., Irawadi T.T, Nur M.A., Syamsu K., dan Arkenan, Y., 2007, Ekstraksi Xilan dari Tongkol Jagung, *Jurnal Pascapanen*, **4**(1): 38-43.
- Richana, N., Irawadi T.T, Nur M.A., dan Syamsu K., 2008, Isolasi Identifikasi Bakteri Penghasil Xilanase serta Karakterisasi Enzimnya, *Jurnal AgroBiogen*, **4**(1): 24-34.
- Septiningrum, K., dan Apriana, C., 2011, Produksi Xilanase Dari Tongkol Jagung Dengan Sistem Bioproses Menggunakan *Bacillus circulans* Untuk Pra-Pemutihan Pulp, *Jurnal Riset Industri*, **5**(1): 87-97.
- Setyawati, I., 2006, *Produksi dan Karakterisasi Xilanase Mikroba yang Diisolasi dari Tongkol Jagung*, Skripsi, tidak diterbitkan, Fakultas Teknologi Pertanian Institut Pertanian Bogor.
- Sopandi, T., dan Wardah, 2013, *Mikrobiologi Pangan*, Andi Yogyakarta, Yogyakarta.
- Susilowati, P.E., Raharjo S., Kurniawati D., Rahim R., Sumarlin, dan Ardiansyah, 2012, Produksi Xilanase dari Isolat Sumber Air Panas Sonai, Sulawesi Tenggara, menggunakan Limbah Pertanian, *Jurnal Natur Indonesia*, **14**(3): 199-204.
- Thoyib, H., Setyaningsih R., dan Suranto, 2007, Seleksi dan Identifikasi Bakteri Alkalifilik Penghasil Xilanase dari Tanah Bukit Krakitan, *Bioteknologi*, **4**(1): 6-12.
- Trismilah dan Waltam D.S., 2009, Produksi Xilanase Menggunakan Media Limbah Pertanian dan Perkebunan, *Jurnal Teknologi Lingkungan*, **10**(2): 137-144.